

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61D 19/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710062891.3

[43] 公开日 2007 年 7 月 18 日

[11] 公开号 CN 100998524A

[22] 申请日 2007.1.19

[21] 申请号 200710062891.3

[71] 申请人 北京锦绣大地农业股份有限公司

地址 100049 北京市海淀区四季青廖公庄 166 号

[72] 发明人 李海洋 张红霞 王 月 孟昭霞
吴亦芳 张向利 郭丽丽 安 晶
郭 敏 王 海 李荣旗

[74] 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司

代理人 张 涛

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

牛性控胚胎生产方法

[57] 摘要

本发明“牛性控胚胎生产方法”涉及胚胎工程领域，特别是涉及利用流式细胞分离仪分离精液技术，结合超数排卵法生产牛的性控胚胎。实现本发明的先是应用流式细胞分离仪分离精液，得到 X 精子；对牛使用促卵泡素 (FSH) 和氯前列烯醇 (PG) 超数排卵并用分离得到的 X 精子进行人工授精，冲胚，得到雌性胚胎。本发明能够扩繁奶牛 (雌性)，增加高产奶牛的数量，同时通过性别控制，能够大大降低奶牛公牛的出生的比率，增加母奶牛的出生比率。

1.牛性控胚胎生产方法，步骤如下：1) 流式细胞分离仪分离精液，得到 X 精子；2) 以放栓为第 0 天，第 4 天早晚各注射一次 70mg 的促卵泡素 (FSH)，第 5 天早晚各注射一次 60mg 的 FSH，第 6 天早晚各注射一次 40mg 的 FSH，第 7 天早晚各注射一次 30mg 的 FSH 和 0.4mg 的氯前列烯醇 (PG)，并于第 7 天下午注射完后撤栓，第 8 天不做处理；3) 第 9 天和第 10 天人工授精；4) 第 16 天进行冲胚并注射 0.4mg 的 PG 和 160 万单位青霉素一支和 100 万单位/支的链霉素一支，第 24 天注射 0.4mg 的 PG；5) 检胚，得到雌性胚胎。

2.权利要求 1 所述的牛性控胚胎生产方法，所述的人工授精，授精部位在子宫角。

3.权利要求 1 或 2 所述的牛性控胚胎生产方法，所述的人工授精，授精的时间是牛发情后 8—12 小时开始第一次的授精，隔 8—12 小时后进行第二次的授精。

牛性控胚胎生产方法

技术领域

本发明涉及胚胎工程领域，特别是涉及利用分离精液技术结合超数排卵法生产牛的性控胚胎。

背景技术

牛性控胚胎产业化生产的基本原理是应用奶牛超数排卵技术和分离精液（X 精子或 Y 精子）生产性别控制胚胎，结合胚胎移植（ET）技术快速扩繁高产奶牛（母牛），增加高产奶牛数量。

奶牛超数排卵和胚胎移植技术：胚胎移植是将一头良种奶牛配种后的早期胚胎取出，移植到另一头同种的生理状态相同的奶牛体内，使之继续发育成为一个个体的技术。为了使供体母畜多排卵，通常要用促性腺激素处理，这个处理过程称为超数排卵。由于牛经济价值高，属单胎动物，产仔数量少，繁殖周期长，用胚胎移植技术进行纯种扩群繁殖和黄牛改良效果好，速度快。

在母牛的生育中有目的的控制母奶牛的性别，性别控制是一有效措施。决定哺乳动物的性别的基因是 Y 染色体上的一个核心区基因，即 SRY（Sex-determining region of the Y Chromosome）基因。Y 精子与卵母细胞结合得到雄性动物，X 精子与卵母细胞结合得到雌性动物，对于奶牛，人们希望得到雌性奶牛，用于更快的扩繁种群和产奶。对于进行性别控制的方法，目前科学界一致认为最理想的方法是对精子进行分离，分离 X-精子或 Y-精子，分离的精子用于人工授精、体外受精和超数排卵结合胚胎移植获得已知性别的后代，这是一种最经济、最实用的性别控制的方法。动物的精子与卵子结合后形成动物胚胎。在母牛出生时其卵巢上有 6—10 万个卵母细胞，随着年龄的增长，数量进一步减少，能够发育成熟并排出的卵母细胞是极少数的。奶牛为单胎动物，一个发情周期仅排卵 1 枚，怀孕期间不发情排卵，在实际生产中，由于妊娠、哺乳乏情、冬季休情等因素的影响及母牛实际利用年限的限制，多数母牛一生仅排几十个卵子，不足卵巢卵母细胞数的 0.1%，有 99.9% 的卵母细胞都没有发育成熟，没有起到应有的作用。超数排卵技术即利用生殖激素刺激卵泡生长和发育，可使奶牛排出较正常多几倍、十几倍的卵母细胞，在人工授精后形成奶牛胚胎。

超数排卵和胚胎移植技术对于挖掘优秀母畜的繁殖潜力意义重大。

发明内容

本发明对奶牛的超数排卵技术和应用分离精液生产奶牛性别控制胚胎进行研究，优选用于生产性控胚胎的超数排卵方案及促卵泡素（FSH）和氯前列烯醇（PG）剂量，确定分离精液在超排时的输精部位，输精剂量建立生产奶牛性别控制胚胎技术平台。

牛性控胚胎生产方法，步骤如下：1）流式细胞分离仪分离精液，得到 X 精子；2）以放栓为第 0 天，第 4 天早晚各注射一次 70mg 的促卵泡素（FSH），第 5 天早晚各注射一次 60mg 的 FSH，第 6 天早晚各注射一次 40mg 的 FSH，第 7 天早晚各注射一次 30mg 的 FSH 和 0.4mg 的氯前列烯醇（PG），并于第 7 天下午注射完后撤栓，第 8 天不做处理；3）第 9 天和第 10 天人工授精；4）第 16 天进行冲胚并注射 0.4mg 的 PG 和 160 万单位青霉素一支和 100 万单位/支的链霉素一支，第 24 天注射 0.4mg 的 PG；5）检胚，得到雌性胚胎。

所述的牛性控胚胎生产方法，所述的人工授精，授精部位在子宫角。

所述的牛性控胚胎生产方法，所述的人工授精，授精的时间是牛发情后 8—12 小时开始第一次的授精，隔 8—12 小时后进行第二次的授精。

实验所用的促卵泡素（FSH）购自中科院动物所，规格是 10mg/瓶，实验所用的氯前列烯醇（PG）购自上海计划生育研究所，规格是 0.2mg/2ml/支。

X、Y 染色体精子的分离是应用流式细胞分离仪进行，根据 X 精子和 Y 精子 DNA 的含量差异（X 精子头部的 DNA 含量比 Y 精子要高出 3-4%），在精子分离前用荧光染料 Hoechst33342 对精子染色，Hoechst33342 染料可渗透精子膜从而使 DNA 着色。由于着色量与 DNA 量成正比，因此 X 精子发出的荧光比 Y 精子强，由于光的强弱它们带有不同的电荷，X 精子和 Y 精子通过高压的电场后便可发生偏转，分别流入不同的收集器内而得到分离的精液，分离的准确率 90%以上。结合超速排卵技术及准确剂量的促卵泡素（FSH）和氯前列烯醇(PG)的注射剂量，以及恰当的输精部位子宫角，在冲胚后每头奶牛能够得到 3—5 枚的早期胚胎。得到早期胚胎后，经过胚胎移植，奶牛怀孕后，产下母奶牛。经验证，经过该性控胚胎的生产方法得到的早期胚胎是雌性胚胎。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明作进一步的详细说明。

实施例 1 牛精液的分离，得到 X 精子

1、试剂

柠檬酸钠（分析纯），果糖（分析纯），18k Ω 超纯水，鲜鸡蛋，丙三醇(分析纯)，青霉素（160 万单位），链霉素（100 万单位），0.9%生理盐水，NaCl, KCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄, HEPES, CaCl₂•2H₂O, MgCl₂•6H₂O, BSA, 丙酮酸钠，乳酸钠

2、实验器材及设备

洁净工作台，显微镜，水浴锅，恒温板，电子天平，纯水机，磁力搅拌器，卡苏低温操作柜，流式细胞分离仪，液氮罐，滤纸，20ml 注射器，量筒，三角瓶。

3、操作步骤

3.1 精子的准备

3.1.1 冻精的解冻：38~42℃水浴 15s。

3.1.2 精液的平衡：为了提高 Hoechst 染料的渗透率，要在 35℃的恒温箱中平衡 1h。

3.2 洗精子、染色

3.2.1 洗精液的配制：6.66g NaCl/L, 235mg KCl/L, 168mg NaHCO₃/L, 47mg Na₂HPO₄/L, 2.38g HEPES/L, 10mg 酚红/L, 390mg CaCl₂•2H₂O/L, 100mg MgCl₂•6H₂O/L, 6.0g BSA/L, 110mg 丙酮酸钠/L, 60%的乳酸钠。

3.2.2 将 1ml 的精液加入到 10ml 的离心管中，加入 5ml 洗精液，混匀 200×g 离心 5min 后，去掉上清液后再加入 5ml 洗精液混匀后再离心。去掉上清液后用 0.5ml 的洗精液再悬浮，加入 Hoechst 33342(Hoechst 33342 的终浓度为 5 μ g/ml)后 35℃的恒温箱中平衡 1h。

3.3 分离精子

3.3.1 流式细胞分离仪的仪器设定：设定流式细胞分离仪的喷嘴直径为 70 μ m，待分离的精液。

3.3.2 分离精子：将处理好的精液导入流式细胞分离仪，开始分离精子。

3.4 收集精子

经分离后的精液收集 X 精子，开始进行冷冻。

3.5 精液的冷冻

3.5.1 基础液的配制（以 100ml 超纯水为例）

电子天平准确的称出相应的柠檬酸钠 2.97g、果糖 2.5g，放入已消毒好的烧瓶内，加入相应的 18KΩ 超纯水(100mL)，用磁力搅拌器搅拌均匀。

紫外线消毒灭菌 30min 后，用酒精棉将洁净工作台消毒，然后将已消毒好的鸡蛋、注射器、量筒、丙三醇、滤纸等放入洁净工作台上，打开鸡蛋，要检查是否新鲜，然后将卵黄放到滤纸上轻轻滚动，待蛋清滤净后，用注射器吸取相应的卵黄 20mL，然后加入青霉素，链霉素各 10 万单位，用磁力搅拌器搅拌均匀后为 I 液，取 I 液 65mL 加入相应量已高压灭菌好的丙三醇 8mL，然后搅拌均匀为 II 液。

3.5.2 精液的冷冻 收集 X 精子后加入 II 液开始冷冻。精液冷冻采用细管分装法，分装 0.25ml/管。每支性控冻精精子含量 200—240 万，解冻后活力达到 0.4--0.5。

实施例 2 胚胎生产

1 试剂

新洁尔灭，盐酸利多卡因，杜氏磷酸缓冲液 (PBS)，0.9%生理盐水，酒精棉球，青霉素 (160 万单位)，链霉素 (100 万单位)，氯前列烯醇 (PG)，上海计划生育研究所，规格 0.2mg/2ml/支；促卵泡素 (FSH)，中科院动物所，规格 10mg/瓶。

2 实验器材

超排所需器材：冲卵管 (16#)，直剪 18cm，弯止血钳 18cm，剪毛剪 (18cm)，通芯，烧杯 500ml，滤器，输液架，10ml 注射器，三通管，乳胶管，夹子，1ml 注射器，洗瓶 500ml。

3 仪器：液氮罐，胚胎移植车，B 超仪。

4 操作步骤

4.1 供体母牛的选择：

4.1.1 年龄在 18 月龄以上荷斯坦的奶牛，肉牛达到成熟体重的 65%-70%，奶牛要在产后 2 个月以上。母牛营养全面平衡，膘情达到中上等为宜。

4.1.2 发情周期正常。至少 2-3 个情期正常，每个发情周期 18-24 天之间。

4.1.3 无生殖器官疾病，无传染性疾病，超排前 2-3 个月以内最好不注射各类疫苗；供体牛无对激素及其他药品的过敏史。

4.1.4 卵巢要求有弹性、质地好、无卵泡囊肿和黄体囊肿；卵巢系膜及卵巢与腹腔无粘连现象；子宫角质地柔软、无炎症、硬肿现象；直肠要求无炎症、过肥、紧缩现象。

4.1.5 卵巢要求在上次超数排卵后，虽有退化黄体，但要求质地柔软、有弹性；卵巢发育静止时不能做超排；高产奶牛产奶高峰时产奶量不低于 25 公斤不做超排。

连续两次以上冲胚效果不好的牛，要查找原因，暂不用于超排，可进行配种，使其妊娠。

4.2 配种:

牛发情后 8-12 小时开始用实施例 1 所分离得到的 X 精液进行第一次输精，剂量，隔 8-12 小时作第二次输精。输精的剂量是每次一支。

4.3 注意事项

4.3.1 激素剂量准确无误。

4.3.2 输精时要稳、准、避免对卵巢强烈刺激。

4.3.3 输精部位在子宫角。

4.3.4 冻精解冻后精子活力要求 0.35 以上。

4.4 冲胚方法:

4.4.1 冲胚时间：以发情当天为 0 天，于第 7d-8d 开始冲胚。也就是说，以放栓为第 0 天，超排冲胚是第 15d-16d。这个时间可以比较灵活，因为发情有时候会是第 8 天早上，也可能是下午，这个与牛只本身有关，冲胚时间就是按照发情的时间具体确定。

4.4.2 冲胚前准备:

4.4.2.1 每头牛冲两侧子宫角，共需 1000mlPBS。

4.4.2.2 凡所用器械均需事先高压灭菌消毒（金属高压、塑料制品气体灭菌）

4.4.2.3 将器械车放于牛的左侧，上面摆好剪毛剪、持针钳、镊子各一把，冲洗瓶一个，500ml 烧杯一个（盖上滤器）、或集卵杯、通芯、导管、酒精棉球，输液架立于六柱栏旁挂上 PBS，吊瓶连接硅胶管并与滤器相连接。

4.4.3 方法

4.4.3.1 清除粪便后将牛的肛门及附近冲洗消毒，操作者指甲剪短，手臂用清水洗净并消毒，佩带一次性塑料长臂手套，涂少量润滑油。

4.4.3.2 不要用力过猛，要缓慢，依肠腔向前伸入。努责和直肠扩张时，手在直肠内暂时不动。不能过度刺激肠粘膜。

4.4.3.3 冲胚前 10 分钟进行荐尾椎间隙或第一、二尾间间隙硬膜外麻醉，注射 6ml 2% 盐酸利多卡因。首先用手抬举尾根，用手触摸间隙部位，在荐尾椎用剪毛剪剪毛，碘酒消毒，再用酒精脱碘。然后将盐酸利多卡因吸入 10ml 注射器，用 9 号针头呈 45 度左右方向刺入皮内，再刺入硬膜。最后在针头上滴一滴盐酸利多卡因看是否下渗，若下渗即可注入。

- 4.4.3.4 用 0.01%新洁尔灭消毒外阴部，用灭菌生理盐水冲洗后，吸水纸拭干。
- 4.4.3.5 冲卵管用酒精消毒后冲卵液冲洗，检查气囊是否完好。
- 4.4.3.6 将通芯插入冲卵管，一手通过直肠把握子宫颈，另一手将冲卵管通过子宫颈进入一侧子宫角大弯部。
- 4.4.3.7 根据子宫颈粗细冲入一定量气体，抽出通芯。
- 4.4.3.8 开始注入 30ml 左右 PBS，再将子宫角提高并轻轻按摩，使 PBS 回流到滤器中，反复五次左右，然后每次注入量加到 50ML 左右，每侧冲洗总量为 500ml PBS，一侧子宫角冲卵后，立即将回收液送实验室检胚，得到 5 枚的胚胎。
- 4.4.3.9 冲完一侧子宫角，抽出冲卵管，用生理盐水冲洗干净。
- 4.4.3.10 按上述方法冲另一侧子宫角。
- 4.4.3.11 冲完后肌注 PG0.4mg/头，青霉素（160 万单位/支）链霉素（100 万单位/支）每头牛各两支注入子宫。
- 4.4.3.12 冲胚结束后应将冲卵管立即泡入清水中进行清洗。
- 4.5 注意事项：
- 4.5.1 插导管时要轻，防止损伤子宫颈或子宫角内膜。
- 4.5.2 注 PBS 时不能多、快、猛。
- 4.5.3 遇冲卵管插不进去时，不要强行，检查通芯是否穿出管外。
- 4.5.4 宫颈粘液较多时，可用粘液吸取管先将黏液清除后再进行冲胚。

放栓为 0 天，第 4 天开始注射 FSH，第 7 天撤栓。

第 4 天	早：6:00	70mg
	晚：18: 00	70mg
第 5 天	早：6: 00	60mg
	晚：18: 00	60mg
第 6 天	早：6: 00	40mg
	晚：18: 00	40mg
第 7 天	早：6: 00	30mg+PG0.4 mg
	晚：18: 00	30mg+PG0.4 mg+撤栓
第 8 天	不处理（发情）	
第 9 天	晚：18: 00	人工授精（AI）
第 10 天	早 8: 00	人工授精（AI）

第 16 天 冲胚+PG0.4 mg+青霉素 (160 万单位/支)+链霉素 (100 万单位/支)

第24天 PG0.4 mg

5. 验胚

5 枚胚胎经移植到适合母体受孕，经 280 天后产下小牛，为母奶牛。